ÉTUDE COMPARATIVE DES DIMÈRES DU DIHYDROXY-5,8 NAPHTALÈNE PRÉCURSEURS DES MÉLANINES CHEZ LES CHAMPIGNONS

M.L. BOUILLANT*, J. BERNILLON, J. FAVRE-BONVIN, L. SOULIER et N. SALIN

Laboratoire de Mycologie, Université Claude-Bernard, Lyon I, 69622 Villeurbanne Cedex

RÉSUMÉ - Un dimère du dihydroxy-5,8 naphtalène: le bis-2,2′ naphtalènetétrol-1,1′,8,8′, un nouveau précurseur de la mélanine chez *Sordaria macrospora* a été isolé de ce Champignon. Sa structure chimique a été démontrée par des méthodes spectrales, en comparaison avec son isomère: le bis-4,4′naphtalènetétrol-1,1′,8,8′ présent chez d'autres champignons.

ABSTRACT - A dimer of 5,8-dihydroxy-naphthalen: 2,2′-bisnaphthalen-1,1′,8,8′-tetrol, a new melanin precursor in *Sordaria macrospora*, has been isolated from this fungus. Its chemical structure has been demonstrated by spectral methods, by comparison with its isomer: 4,4′-bisnaphthalen-1,1′,8,8′-tetrol isolated from other fungi.

MOTS CLÉS : *Sordaria macrospora, Daldinia concentrica*, Ascomycètes, mélanine, dihydroxy-5,8 naphtalène, bis-2,2′ naphtalènetétrol-1,1′,8,8′, bis-4,4′ naphtalène-tétrol-1,1′,8,8′.

INTRODUCTION

Il a été récemment montré (voir les mises au point de Bell & Wheeler, 1986; Wheeler & Bell, 1988) que chez certains Hyphomycètes et Ascomycètes, la formation des mélanines s'effectuait par une voie de biosynthèse dérivée de condensations polyacétyliques, dite du dihydroxy-1,8 naphtalène (DHN, **1**, Fig. 1). Si les différentes étapes conduisant au DHN semblent bien établies, par contre, les réactions de polymérisation ultérieures de ce monomère le sont beaucoup moins.

---

* Adresse actuelle: Laboratoire d'Ecologie Microbienne (URA 697). Univ. Cl. Bernard, Lyon I, 69622 Villeurbanne Cedex.

Un dimère du DHN (**2**) a cependant été découvert chez plusieurs Xylariales: d'abord chez *Daldinia concentrica* (Bu'Lock & Allport, 1957; Allport & Bu'Lock, 1958, 1960), où il s'accumule en grande quantité dans le carpophore mûr et où sa structure chimique a été établie en comparant les dérivés acétylés des produits naturel et synthétique; il est également présent chez *Hypoxylon fuscus* (Gunawan, 1982). Ce bis-4,4'DHN donne facilement la pérylène quinone **3** isolée des mêmes champignons mais aussi d'autres Xylariales: *Bulgaria inquinans* (Edwards & Lockett, 1976), *Hypoxylon sclerophaeum* (Whalley & Whalley, 1977).

Nous avons précédemment démontré (Bouillant et al., 1989) que la mélanogenèse de l'Ascomycète *Sordaria macrospora* s'effectuait également par la voie du DHN. Nous décrivons maintenant l'isolement et la caractérisation du dimère 4 (bis-2,2'DHN), issu d'un autre type de dimérisation de **1** et, selon toute vraisemblance, précurseur de la mélanine

HO OH

1

HO OH
1 8
2 7
3 6
4 5
4' 5'
3' 6'
2' 7'
1' 8'
HO OH

2

HO O
HO O

3

HO 8' 7' 6' 5' 4' 3'
HO 1'
HO HO 1
8 7 6 5 4 3 2 2'

4

HO OH
HO OH

HO O
OH
HO O OH

II

chez ce champignon. Ce composé n'a jamais été décrit à l'état naturel, ni synthétisé. Cependant, dans les mises au point précitées, Bell & Wheeler le considèrent comme un précurseur possible de la mélanine. Au cours de cette étude, nous comparons les diverses propriétés spectrales et chromatographiques des dimères **2** et **4** qui se trouvent ainsi caractérisés pour la première fois par des techniques modernes d'identification.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Appareillage utilisé

Les spectres U.V. ont été enregistrés sur un appareil Kontron (Uvicon 810); les spectres de masse en IE (70 eV) sur un spectrographe MN 305 (VG), en FAB sur un appareil ZAB 3F (VG); les spectres de RMN ^{1}H, à 300 MHz, sur un appareil Brucker, AM 300.

Isolement des composés

1 - Isolement du dimère **2** à partir du carpophore de *D. concentrica*.

Un carpophore mûr de *Daldinia concentrica* (Bolton) Ces. & de Not récolté *in natura* (Ø environ 6cm), est coupé puis broyé au mortier. La poudre obtenue est extraite à température ambiante par 300ml d'hexane (extrait non retenu), puis, par le même volume d'AcOEt. La solution obtenue, qui présente une intense fluorescence bleue à 360nm, est concentrée sous vide à petit volume et le résidu purifié par CCM à centrifugation (Chromatotron), en atmosphère inerte, dans le solvant Hexane-AcOEt-MeOH 6:4:1. Le produit est examiné le plus rapidement possible en ^{1}H RMN, SM et UV, puis soumis à acétylation. SM:FAB, $M-H^{-}$ à m/z 317.

2 - Acétylation du dimère **2.**

215mg sont dissous dans 5ml d'Ac_2O additionnés d'une quantité catalytique de diméthylaminopyridine. Après 24h à température ambiante, la solution est versée sur un mélange eau-glace et, après repos, le précipité obtenu est filtré, lavé à l'eau jusqu'à neutralité et recristallisé dans AcOEt. Après deux cristallisations on obtient 46mg de cristaux blanc-crème, purs en CCM. F= 244°C (Litt. Allport & Bu'Lock, 1960, 245°C).

Spectre UV λ max/MeOH: nm (ε) 232, 280 ep., 295 (15000), 302 ep.; λ max/MeOH + OH^{-} : nm 335, 348.

Spectre de masse: m/z (int. rel. %), M^{+} 486 (11), 444 (13), 402 (29), 360 (34), 318 (100), 299 (26), 289 (6), 271 (12), 213 (6).

3 - Isolement du dimère **4** à partir des milieux de culture de *S. macrospora*.

La souche sauvage de *Sordaria macrospora* (Auersw.) est ensemencée dans 150 erlens contenant chacun 50ml de milieu (Bouillant et al., 1989) et les cultures sont incubées à 24-25°C pendant 4 jours. Après avoir été séparés du mycélium par filtration, les milieux de cultures sont extraits 2 fois par le même volume d'AcOEt et les extraits concentrés à sec. Toutes les opérations de purification ont ensuite été conduites le plus rapidement possible en évitant au maximum lumière et oxygène. Les résidus repris par le minimum de MeOH sont d'abord passés en 3 fois sur 6 colonnes Sepak C_{18} (Waters) lavés par H_2O (100ml), MeOH 30% (100ml) puis MeOH 80% qui élue la fluorescence bleue. Les extraits issus de cette prépurification sont concentrés à sec et purifiés par HPLC préparative sur colonne en phase inverse (Microbondapak C_{18}, 10μ, 0.4 x 30mm), dans l'acétonitrile 60%. Par concentration à sec on obtient un produit amorphe, pur en CCM et HPLC, qui est *pro parte* utilisé pour la RMN et la SM et *pro parte* immédiatement acétylé.

Spectre UV: voir Tab. 1; SM: FAB, M-H- à m/z 317.

4 - Acétylation du dimère **4**.

Cette réaction a été effectuée dans les conditions décrites pour le composé **2**. Après hydrolyse du mélange réactionnel par le mélange eau-glace, un précipité huileux, impossible à filtrer, est obtenu. Après extraction par l'AcOEt et lavage à l'eau jusqu'à neutralité, on obtient, après évaporation et purification sur CCM dans Hexane-AcOEt 6:4, un dérivé acétylé (**4a**) chromatographiquement pur mais qui n'a pu être cristallisé.

SM: m/z (int. rel.%), M^+ 486 (0.8), 444 (10), 402 (25), 384 (22), 342 (100), 318 (78), 317 (22), 301 (21), 300 (88), 299 (20), 286 (5), 271 (14), 213 (6).

Cinétique de production du composé 4

La même souche est ensemencée dans 22 erlens contenant chacun 50ml du milieu précédent et mise en culture à 24°C, en conditions lumière-obscurité 12h-12h. Deux erlens sont prélevés chaque jour, pendant 11 jours, et les milieux de culture filtrés et congelés. A la fin du cycle de culture, les milieux sont extraits par AcOEt (2 fois 100ml par jour) et dosés en HPLC (colonne analytique en phase inverse C_{18}), dans l'acétonitrile à 60%.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le bis-4,4'naphtalènetétrol-1,1',8,8' (**2**) et le bis-2,2'naphtalènetétrol-1,1',8,8' (**4**) ont des comportements spectraux et chromatographiques très différents (voir Tabl. 1):

- le spectre UV du composé **2** (λ max/MeOH nm: 226, 311, 324, 338) se rapproche beaucoup de celui du monomère **1** (λ max/MeOH nm: 225, 293ep., 306, 320, 334) le groupement chromophore n'étant pas modifié par

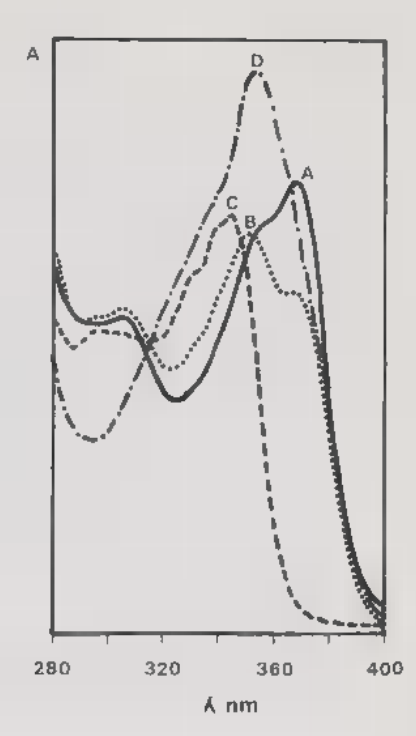


Fig. 2. - Spectre UV du composé **4**: A/ MeOH, B/ id. 2 mn à 60-70°C, C/ id. $+H^+$, D/ id. $+OH^-$.

Fig. 2. - UV spectrum of compound **4**: A/ MeOH, B/ id. 2 min. at 60-70°C, C/ id $+H^+$, D/ id. $+OH^-$.

cette *para* dimérisation. Par contre la proximité spatiale des hydroxyles en 8 et 1´ chez **4** se traduit par une forte bathochromie (Fig. 2, spectre A). Cependant, un déplacement hypsochrome important (20nm) peut être obtenu par simple chauffage (spectre B), acidification (spectre C) ou alcalinisation (spectre D). Ce phénomène peut, selon toute vraisemblance, être attribué à l'existence d'une liaison H entre deux hydroxyles. Nous avons observé les mêmes anomalies spectrales avec la datiscétine (**5**), un flavonoïde qui possède le même type de substitution. La forme non liée semble chimiquement favorisée.

Tableau 1: Propriétés chromatographiques et spectrales UV des composés **2** et **4**.
Table 1: Chromatographic and spectral UV properties of compounds **2** and **4**.

	CLHP(Tr min.)[a]	CCM[b] 1	CCM[b] 2	Spectre UV[c]
2	3.2	0.80	0.80	226,311,324,338
4	4	0.23	0.80	222,266,303,351ép.,366
1	-	0.87	0.87	225,293ép.,306,320
Sordariol*	2.5	0.25	0.25	

a: colonne Microbondapak C_{18}, ACN 60%, débit 1ml/min, détection à 254 et 354nm; b: Plaques de gel de silice F_{254}: 1 - Hexane-AcOEt-MeOH 6:4:1, 2 - id. avec 1 goutte d'AcOH ou d'HCl, c: dans MeOH. * Bouillant et al. 1988.

- le comportement chromatographique en CCM (gel de Silice) montre aussi de grandes différences entre **2** et **4**. Cependant, l'addition d'une trace d'acide dans le solvant suffit à redonner au composé 4 un Rf normal, identique à celui de **2**, plus en rapport avec sa lipophilie théorique.

Les spectres de RMN[1]H des composés natifs et de leurs dérivés acétylés **2a** et **4a** sont reportés dans le Tableau 2.

Tableau 2 - Données de RMN[1]H pour les composés **2** et **4** et leurs acétates **2a** et **4a**.*

Table 2: [1]H NMR data for compounds **2** and **4** and their acetates **2a** and **4a**.

H	2	4	2a	4a
2	6, 81 d (7,7)	-	7, 24 d (7,7)	-
3	7, 15 d (7,7)	7, 27 d (8,7)	7, 47 d (7,7)	7, 82 d (8,4)
4	-	7, 51 d (8,7)	-	7, 84 d (8,4)
5	6, 69 d (8)	7, 21 d (4,3)	7, 14 dd (5,6-3)	7, 41 d (8,5)
6	7, 03 t (8)	7, 21 d (4,3)	7,30 m	7, 51 t (7,9)
7	6, 69 d (8)	6, 66 t (4,3)	7, 36 m	7, 17 d (7,6)
OAc	-	-	2, 46 & 2, 47	2, 37 & 1, 98

* **2** et **4** dans CD_3OD, **2a** et **4a** dans $CDCl_3$; δ ppm (J Hz), ref. TMS.

Dans le spectre des composés natifs, les différences de déplacements chimiques entre les couples de H *ortho*: H2 et H3 de **2** et H3 et H4 de **4**, traduisent leur position au voisinage **(2)** ou non **(4)** d'un groupement OH. Le couplage de J = 4,3 Hz (couplage virtuel) obtenu avec les H en 5,6 et 7 du composé **2** est également remarquable.

Le spectre du dérivé acétylé de **4** permet de mettre en évidence un empêchement de rotation qui se traduit par l'élargissement du signal d'un des groupements acétyles, lequel peut être affiné par simple chauffage. Le déplacement chimique de ce signal (1,98 ppm), insolite pour un groupement acétyle aromatique, prouve sa localisation dans le cône de blindage d'un noyau aromatique.

Le spectre de masse en IE des dérivés acétylés **2a** et **4a** montre la présence d'ions correspondant aux pertes successives des groupements acétyles, avec cependant, dans le spectre du composé **4a**, la présence d'un ion correspondant à M-2Ac-H_2O ou à M-Ac-AcOH, inexistant dans celui du composé **2a**.

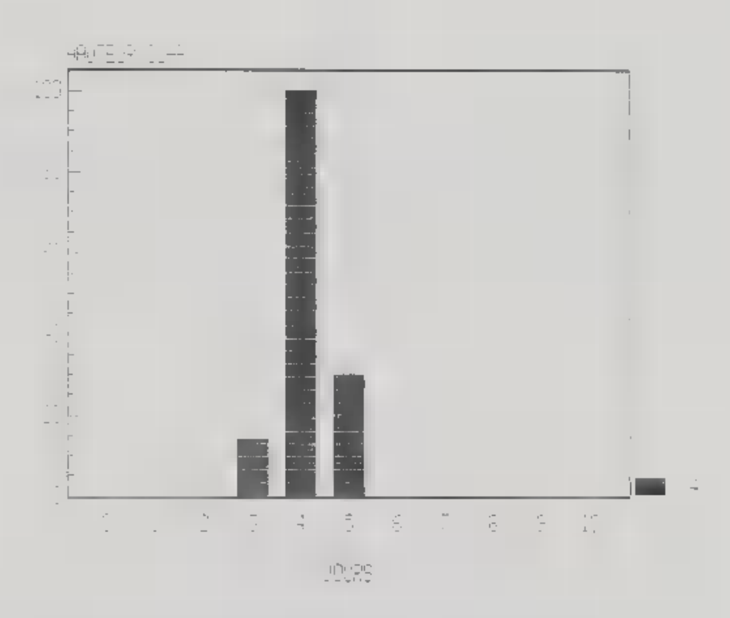


Fig. 3. - Cinétique de production du composé **4** chez *S. macrospora*.

Fig. 3. - Cinetic of production of the compound **4** in *S. macrospora*.

Bien que les premières étapes de la voie de formation du DHN puissent être communes à de nombreux champignons, en particulier Ascomycètes, nous avons démontré, par ce travail, qu'il existait au moins deux types de dimérisation possibles de ce composé à l'état naturel. Cependant, une question reste posée: ces substances coexistent-elles chez le même champignon, contribuant à la formation de la même mélanine? Il faut remarquer que chez les deux champignons que nous avons étudiés, nous n'avons pas mis en évidence le deuxième dimère lorsque le premier était présent.

Il faut également noter que le composé **2** est un produit d'accumulation dans le carpophore mûr de *D. concentrica*, alors que le dimère **4** n'a qu'une existence fugace (voir Fig. 3), corrélée à la mise en place des structures reproductrices, et n'est en aucun cas présent dans les ascospores chez *S. macrospora*.

Les dimères **2** et **4** sont tous deux très facilement oxydables à l'air. Les pigments sombres obtenus sont cependant différents: brun rouge avec **2**, gris vert avec **4**. Ces nuances de colorations mélaniques, que l'on retrouve d'ailleurs *in vivo*, pourraient être un argument en faveur de l'existence de mélanines spécifiques. Toutes questions restent cependant posées en ce qui concerne les modalités des polymérisations ultérieures.

BIBLIOGRAPHIE

ALLPORT D.C. and BU'LOCK J.D., 1958 - The pigmentation and cell wall material of *Daldinia* sp. *J. Chem. Soc.* 4090.

ALLPORT D.C. and BU'LOCK J.D., 1960 - Biosynthetic pathways in *Daldinia concentrica*. *J. Chem. Soc.* 654-662.

BELL A.A. and WHEELER M.H., 1986 - Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual Rev. Phytopathol.* 24: 411-451.

BOUILLANT M.L., FAVRE-BONVIN N., SALIN N. and BERNILLON J., 1988 - Sordariol and related compounds, hexaketides in the fungus *S. macrospora*. *Phytochemistry* 27: 1517-1519.

BOUILLANT M.L., GROUT P., BERNILLON J., FAVRE-BONVIN J., SALIN N. et ARPIN N., 1989 - Biosynthèse de la mélanine chez *Sordaria macrospora*. *Cryptogamie, Mycol.* 10: 257-264.

BU'LOCK J.D. and ALLPORT D.C., 1957 - A new type of melanin and the biogenesis of a Perylene derivative. *Proc. Chem. Soc.* 264.

EDWARDS R.L. and LOCKETT H.J., 1976 - Constituents of Higher Fungi XVI. Bulgarhodin and Bulgarein, Novel Benzofluoranthrenquinones from the Fungus *Bulgaria inquinans* (Fries). *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* I: 2149.

GUNAWAN S., 1982 - Untersuchungen an Inhaltsstoffen von Ascomyceten und Sesquiterpenen aus Basidiomyceten. Dissertation, Université de Bonn.

WHALLEY A.J.S. and WHALLEY M.A., 1977 - Stromal Pigments and Taxonomy of *Hypoxylon*. *Mycopathologia* 61: 99.

WHEELER M.H. and BELL A.A., 1988 - Melanins and their importance in pathogenic fungi. *In:* Mc GINNIS, *Current Topics in Medical Mycology*. Berlin, Heidelberg & NY, Springer Verlag.